

Überprüfung eines Schnellverfahrens zur Blutalkoholkonzentrations-Bestimmung

von

Michael Becker

aus

Wiesbaden



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548824_0061

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Überprüfung eines Schnellverfahrens zur Blutalkoholkonzentrations-Bestimmung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Michael Becker
aus
Wiesbaden

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. G. Koch
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 1972

Meiner lieben Mutter in Dankbarkeit

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	6
2. <u>Literatur</u>	11
2.1. <u>Historisches zum Problem</u>	11
2.2. <u>Vorproben</u>	11
2.2.1. Alcotest	11
2.2.2. SZOT-Sonde	13
2.2.2. Nagy-Zsigmond-Sonde = Pluralcol-Sonde	14
2.3. <u>Alkohol-Nachweisverfahren</u>	16
2.3.1. Ältere Verfahren zum qualitativen Alkoholnachweis	16
2.3.1.1. Die Lieben'sche Jodoformprobe	16
2.3.1.2. Die Bertholet'sche Probe	16
2.3.2. Verfahren zum quantitativen Alkoholnachweis	17
2.3.2.1. Physikalische Verfahren	17
2.3.2.2. Chemische Verfahren	17
2.3.2.2.1. Redox-Verfahren	17
2.3.2.2.1.1. Widmark-Verfahren	17
2.3.3. Spezifische Nachweisverfahren	21
2.3.3.1. Ferment-Methode (=ADH-Verfahren)	21
2.3.3.1.1. Modifikationen des ADH-Verfahrens	30

2.3.3.1.1.1.	Verfahren nach <u>Kirk</u> , <u>Gibor</u> und <u>Parker</u> (1968)	30
2.3.3.1.1.2.	Verfahren nach <u>Alha</u> und <u>Tamminen</u> (1960)	31
2.3.3.1.1.3.	Verfahren nach <u>Machata</u> (1961)	31
2.3.3.1.1.4.	Automatisierung des ADH-Ver- fahrens (<u>Leithoff</u> 1963)	32
2.3.3.1.1.5.	Ultramethode zur ADH-Bestim- mung (<u>Leithoff</u> u. Mitarb. (1964)	33
2.3.3.1.1.6.	Mikro-ADH-Verfahren (<u>Bernt</u> (1965)	34
2.3.3.1.1.7.	Einfaches Mikro-ADH-Verfahren nach <u>Bremer</u> und <u>Tiess</u> (1969)	34
2.3.3.1.1.8.	Vereinfachte ADH-Methode nach <u>Eskes</u> (1969)	36
2.3.3.1.1.9.	Verwendung von Hydrazinsulfat (rein) für die ADH-Methode (<u>Lohse</u> 1967)	36
2.3.3.1.1.10.	Enzymatischer Schnellnachweis von Äthanol im Kapillarblut von <u>Weidemann</u> (1969)	37
3.	<u>Problemstellung</u>	39
3.1.	<u>Definition und Abgrenzung der Arbeit</u>	41
4.	<u>Literatur zur Methodik</u>	43
5.	<u>Material und Methodik</u>	44

	Seite
5.1. <u>Material</u>	44
5.2. <u>Methodik</u>	44
5.2.1. Apparaturen	44
5.2.2. Reagenzien	45
6. <u>Arbeitsweise</u>	47
7. <u>Ergebnisse</u>	50
8. <u>Diskussion und Zusammenfassung</u>	55
9. <u>Literaturverzeichnis</u>	57

1. Einleitung

Im Zusammenhang mit der allenthalben zu beobachtenden Streßüberforderung des heutigen Menschen, seinem zunehmenden Glauben an die "richtige Tablette" (Mallach 1967; Klein 1964), die ihm zu jeder Zeit Ruhe und Gelassenheit, Aktivität und Konzentration, Wachheit oder Schlaf bringen könne, und dem daraus resultierenden Alkohol- und Arzneimittelmisbrauch stehen wir heute in Toxikologie, Klinik (Unfallchirurgie, Anästhesiologie, Psychiatrie, Neurologie) (Schüppel 1969) und Gerichtsmedizin immer häufiger vor dem Problem der Kombinationswirkung von Alkohol (besonders Äthanol) und Arzneimittel (Schüppel 1969).

Daß oft beide Pharmaka zusammen eingenommen werden, ermittelte Wagner (1963) in 10,3 - 14,5 % seiner Untersuchungen, Osterhaus (1964) in 14,5 % bei 5200 alkoholisierten Kraftfahrern, Klein (1964) gar in 15,2 % von 1500 im Straßenverkehr auffälligen Personen.

Unter Berücksichtigung der Umsatzzahlen für alkoholische Getränke in der BRD - etwa 18 Milliarden DM pro Jahr - und für Arzneimittel - rund 3 Milliarden pro Jahr -, wird die Behauptung, Alkohol und Medikamente würden häufig zusammen genommen, mehr als nur wahrscheinlich

(Soehring und Schüppel 1966).

Wangel (1962) stellte bei der Untersuchung von 4841 Personen, die eine Blutalkoholkonzentration von rund 1,5 ‰ aufwiesen fest, daß 16 % davon gleichzeitig unter Arzneimittelwirkung standen; auch Bonnichsen (1967) stimmt mit seinen Angaben von 12 - 15 % recht gut mit den Zahlen der anderen Autoren überein. (Mallach 1967).

Da es inzwischen allgemein bekannt ist, daß sich Alkohol und Medikamente gegenseitig beeinflussen im Sinne einer Addition, Potenzierung oder auch "negativen Potenzierung" (Lickint 1959; Eerola 1961; Fischer 1962; Wagner 1963; Glass u. Mitarb. 1964; Klein 1964; Osterhaus 1964; Seidel u. Mitarb. 1965; Glass u. Mitarb. 1965; Soehring u. Mitarb. 1966; Melville u. Mitarb. 1966; Glass u. Mitarb. 1966; Noirfalise u. Mitarb. 1966; Laiho u. Mitarb. 1966; Cramer 1966; Schulz 1966; Arnold 1966; Koehler 1967; Mallach 1967; Gaultier u. Mitarb. 1967; Mallach 1967; Cornish u. Mitarb. 1967; Boehle u. Mitarb. 1967; Milner 1968; Iffsits-Simon 1968; Lester u. Mitarb. 1968; Eicke 1969; Schüppel 1969; Smith u. Mitarb. 1969; Vapataalo u. Mitarb. 1969), daß die Kombinationswirkung sogar zu Todesfällen führen kann (Hartung u. Mitarb. 1963; Kiel 1964; Schuth 1964), daß ferner die Grenze, ab der sich auch eine relativ geringe Blutalkoholkonzentration im Zusammenhang mit

Medikamenten tödlich auswirken kann, bei etwa 1 %o liegt, (Osterhaus 1964; Böhle u. Mitarb. 1967), ergibt sich besonders für den erstbehandelnden Arzt, dem in Unfall- und Entgiftungsstationen, Heilanstalten usw. Patienten in bewußtseinsverändertem oder gar bewußtlosem Zustand vorgestellt werden, daß dringende Bedürfnis nach einer

1. schnellen
2. einfach durchzuführenden
3. möglichst genauen
4. von großem Geräte- bzw. Personalaufwand unbelasteten (Kapusz u. Mitarb. 1969)
5. auch bei geringen Blutmengen verwendbaren
6. häufige Venenpunktionen vermeidbaren (Leithoff u. Mitarb. 1964)

Methode zur Erkennung und Differenzierung einer erhöhten Blutalkoholkonzentration bzw. deren Ausschluß (Tiess u. Mitarb. 1969).

Vor allem der chirurgisch tätige Arzt wird gerade bei alkoholisierten Schädel-Hirn-Verletzungen häufig vor die differentialdiagnostisch schwierige Frage gestellt: Trauma allein, Trauma und Alkoholbeeinflussung bzw. Intoxikation, oder Trauma und Alkohol und Medikamentenwirkung kombiniert (Olischläger 1968).

So fanden Ammen u. Mitarb.(1960) bei 63 % der Unfallverletzten eine Alkoholbeeinflussung. Unter 1428 von Kramer (1966) beschriebenen, stationär behandelten Schädel-Hirn-Traumen sollen etwa 20 % zur Zeit der Aufnahme unter Alkoholeinfluß gestanden haben. Bei mehr als 50 % dieser Fälle wäre wegen des Traumas allein eine stationäre Behandlung nicht gerechtfertigt gewesen. An dieser Stelle sei auf die, ähnlich der Kombinationsproblematik Alkohol und Medikamente, wechselseitige Potenzierung der Wirkung des Traumas und des Alkoholes hingewiesen. Ausserdem kann Alkohol ähnliche psychopathologische Symptome wie ein Hirntrauma hervorrufen (Meyer 1967; Oli-schläger 1968 und Kapusz u. Mitarb. 1969).

Obwohl es nun eine fast unübersehbare Zahl an Methoden zur Blutalkoholbestimmung gibt, entfallen die meisten in den eben genannten Situationen aus folgenden Gründen:

1. zu großer apparativer Aufwand
2. Abhängigkeit von Laborpersonal (nachts, Wochenende, Feiertage)
Abhängigkeit von besonders geschultem Laborpersonal
3. zu hoher zeitlicher Aufwand (Oli-schläger 1968)

4. Bedingung der zu großen Blut- bzw. Serummengen (für die Widmark- und die ADH-Methode werden im allgemeinen fast 1 ml Vollblut oder Serum benötigt) (Leithoff u. Mitarb. 1964).

Da die Tendenz, besonders im klinisch-toxikologischen Bereich, aber mehr und mehr dahin geht, bei jedem Patienten, der aufgenommen wird, besonders aber bei solchen mit unklarer Bewußtlosigkeit, als erstes die Frage einer möglichen Alkoholbeteiligung zu klären (Olischläger 1968), wird immer noch nach neuen Methoden gesucht, die die Nachteile 1. - 4. (siehe oben) möglichst nicht aufweisen.

2. Literatur

2.1.

Historisches zum Problem

Da ein Überblick über die bisher bekannten Blutalkoholbestimmungen und deren Modifikationen, und wäre er auch noch so gestrafft, den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde (Grüner 1967 beschreibt als Auswahl allein schon ca. 107 verschiedene Verfahrensweisen), seien nur die gebräuchlichsten und für diese Arbeit wesentlichsten kurz skizziert, sowie ihre Vor- und Nachteile bzw. Fehlermöglichkeiten erwähnt.

2.2.

Vorproben

2.2.1.

Alcotest (nach Grosskopf 1951, 1954; gemeinsam mit Scheibe 1953, Frey 1952, Scheibe und Frey 1953, Sachs 1955):

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht in der Ausnutzung der reduzierenden Wirkung des in der Ausatemungsluft enthaltenen Alkohols, wobei die orangegelbe Farbe des mit Kieselsäuregel vermischten Schwefelsäure-Kaliumbichromates (Indikatorschicht) in die grüne Farbe der Chrom-3-Verbindung umschlägt.

Obwohl dieses Verfahren eine schnelle und wenig aufwendige Methode zur groben Abschätzung der Alkoholbeeinflussung eines Probanden darstellt (Grüner 1967, s. 6), ist es doch mit erheblichen Nachteilen belastet:

- wird der Meßbeutel nicht in einem einzigen Atemzug aufgeblasen, muß mit einer etwas geringeren Verfärbung der Indikatorschicht gerechnet werden,
- zu langsames Aufblasen des Meßbeutels kann selbst bei hohen Blutalkoholkonzentrationen noch zu negativen Ergebnissen führen (Großkopf 1963 erzielte z.B. bei 2 ‰ ein negatives Resultat, wenn der Meßbeutel innerhalb 60 sec. gefüllt wurde),
- der beim Einblasen zu überwindende Widerstand (ca. 50 mm H₂O-Säule entsprechend) stellt für den Probanden eine Belastung dar, die etwa der klinischen Preßdruckprobe entspricht. Nach Wagner (1959) sollte bei Herzwand- oder Aortenaneurysmen, schweren Coronarerkrankungen, Augenerkrankungen, die mit einem erhöhten intraoculären Druck einhergehen, sowie bei Herzkranken mit erheblichen Dekompensationserscheinungen auf diese Alkoholprobe verzichtet werden (Grüner 1967, S. 10),
- es besteht keine Gewähr für die Spezifität des Nachweises (Grüner 1967, S. 12). So können z.B. nach Genuß von Orangensaft bis zu 1 min. fehlerhafte positive Ergebnisse erzielt werden (Grüner 1967, S. 12),

- zwischen Prüfung und letztem Alkoholgenuß müssen mindestens 15 min. verstrichen sein (Olishläger 1968),
- bei einer Blutalkoholkonzentration von mehr als 0,7 ‰ ist dieses Verfahren nicht ausreichend sicher anwendbar, da es lediglich die Tatsache eines Alkoholgenusses anzeigt (Borgmann in Fazekas u. Mitarb. 1965; Olishläger 1968),
- die Blutalkoholkonzentration muß größer als 0,3 ‰ sein, damit eine Reaktion zustande kommt, die einigermaßen exakte Werte ergibt (Fazekas u. Mitarb. 1965),
- ein eventuell aus Kleidern ausströmender Alkoholgehalt ergibt eine Verfälschung des Ergebnisses (Olishläger 1968).

2.2.2.

SZOT-Sonde:

Diese Sonden arbeiten nach demselben Prinzip wie die "Alco-Test"-Alkoholsonde, nur wird statt dem in "Alco-Test" mit Kieselsäuregel vermischten H_2SO_4 -Dichromat als Reagenzmittel, hier dasselbe Reagenz mit entsprechend granuliertem Glaspulver angewandt. Die ursprünglich gelbe Farbe des Reagenzmittels der Sonde wird durch Alkohol reduziert und gelblich-grün verfärbt.

Die SZOT-Sonden zeichnen sich durch keinerlei besonderen Vorteil gegenüber der "Alcotest"-Alkoholsonde aus, haben jedoch den zusätzlichen Nachteil, daß mit ihnen keine quantitative Bestimmung möglich ist. Sie können lediglich zur qualitativen Feststellung eines Alkoholgenusses herangezogen werden (Fazekas u. Mitarb. 1965).

2.2.3.

Nagy-Zsigmond-Sonde = Pluralcol-Sonde (Tiess u. Mitarb. 1969)

Ebenso wie die unter 2.2.1. genannte Alcotest-Alkoholsonde nutzt dieses Verfahren die reduzierende Wirkung des in der Ausatemungsluft enthaltenen Alkohols, nur wird hier als Reagenz, statt der Kaliumbichromat-Schwefelsäure, eine schwefelsaure Ammoniumbichromatlösung verwendet, wobei man aus der verschiedenen Verfärbung des Reagenzmittels, also aus dem Grade der Oxydation, auf das Maß des Alkoholgenusses, ausgedrückt als Blutalkoholwert, schließen kann (Fazekas u. Mitarb. 1965).

Es ergibt sich also hier die Möglichkeit, bessere, d.h. exaktere und empfindlichere Annäherungswerte als bei den beiden erstgenannten Methoden zu erhalten (Fazekas u. Mitarb. 1965; Tiess u. Mitarb. 1969), sodaß dieses Verfahren als semiquantitativ bezeichnet werden kann (Kapusz u. Mitarb. 1969). Neben der größeren Ökonomie

- das Gerät ist nach erneutem Auffüllen wiederholt verwendbar - (Kapusz u. Mitarb. 1969; Tiess u. Mitarb. 1969), zeichnet es sich durch einen geringen Atemwiderstand aus, d.h. es ist auch bei Personen mit verminderter Vitalkapazität, bei Bewußtlosen, sowie durch Vorschalten von Nicht-Rückatmungsventilen sogar bei bewußtseinsgestörten Patienten anwendbar (Tiess u. Mitarb. 1969).

Die Nachweisgrenze liegt niedriger als bei 2.2.1. und 2.2.2, sodaß ein sicheres Erkennen einer Blutalkoholkonzentration ab 0,1 bis 0,2 ‰ auch bei nicht sachgerechtem Blasverhalten, insgesamt eine für viele Fälle hinreichend sichere und genaue Bestimmung der aktuellen Blutalkoholkonzentration im Bereich zwischen 0,1 und 0,8 ‰ möglich ist (Tiess u. Mitarb. 1969).

Dennoch sind auch dieser Methode recht enge Grenzen gesetzt, denn

- das Einblasen muß 2 min. lang möglichst langsam erfolgen,
- es darf kein Speichel in die Sonde geraten,
- vor dem Einblasen darf die zu untersuchende Person nicht essen, rauchen (Fazekas u. Mitarb. 1965) und keine Süßigkeiten zu sich nehmen (Tiess u. Mitarb. 1969),
- außerdem muß der Alkoholgenuß mindestens 25 - 30 min.

vorher abgeschlossen sein, mindestens 15 min. vor der Untersuchung dürfen keine alkoholhaltigen Mittel aufgenommen werden, sowie kein intensiver Umgang mit organischen, leicht flüchtigen, reduzierenden Substanzen (Benzine, Narkose- und Lösungsmittel) erfolgt sein (Tiess u. Mitarb. 1969).

Eine besondere Fehlerquelle weist diese Methode noch dadurch auf, daß plötzliche Temperaturunterschiede die Ergebnisse verfälschen können, d.h. die Prüfung ist nur durchführbar, wenn die Sonde schon Außentemperatur angenommen hat (Fazekas u. Mitarb. 1965).

2.3.

Alkohol-Nachweisverfahren

2.3.1.

Ältere Verfahren zum qualitativen Alkoholnachweis

Aus der Fülle der teilweise nur noch historischen Wert besitzenden, älteren qualitativen Nachweismethoden seien lediglich die beiden in der Entwicklung wichtigsten

2.3.1.1. Die Lieben'sche Jodoformprobe und die

2.3.1.2. Die Bertholet'sche Probe

erwähnt (Grüner 1967, S. 35).

2.3.2.

Verfahren zum quantitativen Alkoholnachweis

2.3.2.1.

Physikalische Verfahren

Sie verwenden die Bestimmung des spezifischen Gewichtes, der Dampfspannung mit dem Geissler'schen Vaporimeter, die Bestimmung des Siedepunktes (Ebullioskop), der Refraktometrie und der Interferometrie (Grüner 1967, S.46 ff).

2.3.2.2.

Chemische Verfahren

Hier sind vor allem folgende zu nennen:

2.3.2.2.1. Die Redox-Methoden, aus denen wegen seiner besonderen Wichtigkeit das

2.3.2.2.1.1 Dichromat-Schwefelsäureverfahren nach Widmark herausgegriffen werden soll, das eine Weiterentwicklung des von Nicloux (1896) erstmals beschriebenen und überhaupt ersten wirklich brauchbaren Verfahrens darstellt (Grüner 1967, S. 54).

Ganz allgemein beruhen die Redox-Verfahren auf folgendem Prinzip:

Alkohol reduziert einen anderen Körper und wird dabei selbst oxydiert. Die andere Substanz kann dabei zugleich

als Indikator dienen, der anzeigt, wann aller Alkohol oxydiert wurde. Als oxydierender Körper wird die Dichromat-Schwefelsäure, seltener Kaliumpermanganat oder Brom verwendet (Grüner 1967, S. 54).

Die hier zu beschreibende Widmark-Methode basiert auf folgenden chemischen Vorgängen:

Alkohol destilliert aus einer kleinen Menge (ca. 100 mg) des Untersuchungsmaterials (Blut, Urin, usw.) in einem geschlossenen System, dem Widmark-Kolben, bei Luftabschluß in Dichromat-Schwefelsäure hinein und wird hierbei gleichzeitig oxydiert. Dieser Vorgang vollzieht sich im Wasserbad (Brutschrank) ohne Aufsicht. Anschließend wird die nichtverbrauchte Dichromat-Schwefelsäure titriert und aus dem Überschuß die Menge des Alkohols berechnet (Grüner 1967, S. 65).

Der besondere Vorteil dieser Methode liegt in ihrer Genauigkeit, da hier ein getrennter Destillationsschritt wegfällt, bzw. mit der Oxydation des Alkohols verbunden und in das Reaktionsgefäß verlegt wird (Widmark-Kölbchen), sodaß sie nicht als besonderer Arbeitsgang der Oxydation und Bestimmung des Äthanols vorausgeschickt zu werden braucht.

Da dieses Verfahren allgemein gebräuchlich ist, sind besonders gute Vergleichswerte vorhanden, ebenso eine

genaue Kenntnis der möglichen Fehlerquellen. Ferner genügen hier schon kleine Mengen Blut (ca. 100 mg) (Grüner 1967, S. 65).

Die möglichen Nachteile bzw. Fehlerquellen ergeben sich aus:

- Ablesefehlern bei der Titration,
- dem Einfluß von Verunreinigungen, die zu einem Oxydationsverlust der Dichromat-Schwefelsäure führen, der sich seinerseits auf die Differenz der Blutproben zu den Analysenwerten auswirkt,
- methodischen Unachtsamkeiten, wie z.B. Belichtung, was einen Verlust an 6-wertigem Chrom bewirkt; aus diesem Grunde ist eine sorgfältige Abschirmung der mit Dichromat-Schwefelsäure beschickten Kölbchen vor Licht unbedingt erforderlich (Grüner 1967, S. 89).

Der schwerwiegendste Nachteil der Methode nach Widmark liegt allerdings in ihrer Unspezifität. So können sowohl endogene Störsubstanzen, wie z.B. Milchsäure, Fruchtsäuren, Glycerin, Acetaldehyd, Ammoniak, Fettsäuren, Aceton, Acetessigsäure, Oxybuttersäure (Diabetes mellitus), erheblicher Obstgenuß, als auch solche exogener Art (fehlerhafte Desinfizientien, Narkosemittel, Äther, Bromäthyl, Paraldehyd, Amylenhydrat, verunreinigte Genuß-

mittel) fehlerhafte Ergebnisse bewirken. Auch gewerbliche Gifte, wie Schwefelkohlenstoff, höhere Alkohole, Ester, chlorierte Produkte, Methylphenole, Methylalkohol, Aceton, Pyridin, Benzin, Benzol, Lacklösemittel und viele andere, die zum Teil durch die Einatmung aufgenommen und langsam eliminiert werden, tragen zu ungenauen Ergebnissen bei. Aus der Reihe der Desinfektionsmittel sind es vor allem solche, die Formaldehyd, Phenolderivate, ätherische Öle, Weinsäure, H_2O_2 oder Chlorate enthalten (Dotzauer u. Mitarb. 1952).

Weiter können sich bei der Leichenfäulnis reduzierende Substanzen entwickeln (Weinig u. Mitarb. 1961), die interferometrisch oder bei chemischen Methoden Alkoholwerte vortäuschen (Dotzauer u. Mitarb. 1952).

Wenn man weiterhin bedenkt, daß der Zeitaufwand der Widmark-Methode 2 Stunden beträgt (Graf 1962) und der Widmark-Faktor von 1,13 keine allgemeine Gültigkeit hat - es werden niedrige Konzentrationen etwas zu hoch (z.B. 0,8 ‰ um 0,7 ‰ zu hoch), hohe Konzentrationen dagegen zu tief (1,8 ‰ z.B. um 0,5 ‰ zu tief) bestimmt (Grüner 1967, S. 90) so wird verständlich, daß man versuchte, diese Methoden durch immer neue Modifikationen in der Apparatur (Grüner 1967, S. 68, 183; Iffland 1968; Gilde-meister 1969) oder auch im Analysengang (Grüner 1967, S. 92, 94, 95, 98, 107; Kirk u. Mitarb. 1958; Meyer-

Döring 1960; Graf 1962; Leithoff 1963; Iffland 1968; Gildemeister 1969) zu verfeinern.

2.3.3.

Spezifische Nachweisverfahren

2.3.3.1.

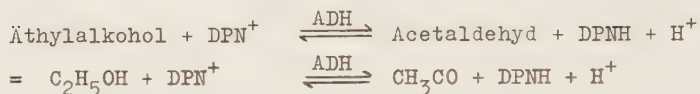
Ferment-Methode (ADH-Verfahren)

Diese Methode bedeutete einen entscheidenden Fortschritt auf dem Gebiete des Alkoholl-Nachweises. Sie geht zurück auf die Untersuchung von Bücher, Redetzki, Dotzauer und Johannsmeier (1952), sowie Bonnichsen, Theorell, Halström und Möller (1954) und hat sich seit Jahren in der forensischen Blutalkoholbestimmung bewährt (Leithoff 1963).

Das Grundprinzip des ADH-Verfahrens wird im folgenden genauer erläutert, da es zugleich auch die biochemische Grundlage der in dieser Arbeit geprüften Modifikation einer Mikrobestimmung bildet.

ADH, ein für Äthylalkohol spezifisches, hochgereinigtes, kristallisiertes Stoffwechselerment, eines der Schlüsselenzyme der alkoholischen Gärung (Dotzauer u. Mitarb. 1952) katalysiert in einem geeigneten Puffersystem eine wasserstoffübertragende Reaktion, bei der Äthylalkohol in Acetaldehyd übergeführt und gleichzeitig DPN (= NAD = das Co-Ferment der Wasserstoffübertragungen im Zellstoff-

wechsel =Co-Zymase = Co-Hydrase I; vergl. Warburg und Christian 1936; Warburg 1948) hydriert wird.



Hierbei übernimmt ADH als Katalysator die Rolle der Selektivität und DPN als H^+ -Acceptor ermöglicht eine einfache quantitative Reaktion (Dotzauer u. Mitarb. 1952; Leithoff u. Mitarb. 1964). Die hydrierte Form des DPN (= DPNH) unterscheidet sich vom (nicht hydrierten) DPN durch eine starke Lichtabsorption im UV-Bereich (Absorptionsbande mit Maximum bei 340 nm). Gemessen wird jedoch bei 366 nm, da es sich als zweckmäßig erwiesen hat, die Quecksilberlinie 366, die stärkste und mit Glasfiltern am einfachsten isolierbare Spektrallinie der Hg-Dampflampe zu verwenden. Strahlung dieser Wellenlänge durchdringt, obwohl nicht mehr sichtbar, noch Glasküvetten und dünnere Glaslinsen, sodaß die Ferment-Methode bei Verwendung einer Hg-Lampe als Lichtquelle in jedem photometrischen Kolorimeter durchführbar ist (Dotzauer u. Mitarb. 1952). Aus der bei dieser Wellenlänge gemessenen - der Menge an hydriertem DPN entsprechenden - Extinktion, läßt sich die Menge des an der Umsetzung beteiligten Äthanolis ermitteln.

Das in obiger Gleichung dargestellte Gleichgewicht ist in neutralem Milieu stark nach links verschoben. Man kann aber den erwünschten Reaktionsablauf nach rechts erreichen, wenn man den pH-Wert zum alkalischen hin verschiebt und einen "Aldehydfänger" (Semicarbacid) verwendet, sodaß in Gegenwart eines Überschusses an ADH nach Ablauf der Reaktion der Äthylalkohol quantitativ zu Acetaldehyd dehydriert worden ist.

Der erwähnte Einfluß des pH-Werts des Milieus beruht auf der Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von der H-Ionenkonzentration (Racker 1950):

$$K = \frac{(\text{Acetaldehyd})(\text{DPN})(\text{H}^+)}{(\text{Alkohol})(\text{DPN}^+)}$$

Bei den Apoenzymen handelt es sich um Zinkproteide (Vallee und Hoch 1955), von denen die Hefe-ADH ein Molekulargewicht von 150 000, die Leber-ADH ein Molekulargewicht von 73 000 besitzt. Während die Hefe-ADH vier Haftstellen zur DPN-Bindung besitzt, sind bei der Leber-ADH nur zwei Haftstellen vorhanden. Nach Theorell und Bonnichsen (1951) sowie Hayes und Velick (1954) beträgt die maximale "turn-over-Zahl", definiert als Anzahl der pro Minute an einer katalytisch aktiven Haftstelle ablaufenden Reaktionen, bei der Hefe-ADH (bei pH 7,9) 6 700, bei der Leber-ADH

(bei pH 8,2) nur 90.

Die Michaeliskonstanten für Hefe- und Leber-ADH ergeben sich aus folgender Tabelle (nach Redetzki und Johannsmeier 1956).

	Hefe-ADH	Leber-ADH
Äthylalkohol	$1,8 \cdot 10^{-2}$ (pH 7,9)	$5,4 \cdot 10^{-4}$ (pH 8,2)
Acetaldehyd	$1,1 \cdot 10^{-4}$ (pH 7,9)	$1,2 \cdot 10^{-4}$ (pH 7,0)
DPN ^{ox}	$1,7 \cdot 10^{-4}$ (pH 7,9)	$1,3 \cdot 10^{-5}$ (pH 7,0)
DPN ^{red}	$2,3 \cdot 10^{-3}$ (pH 7,9)	$1,2 \cdot 10^{-5}$ (pH 7,0)

Die Michaeliskonstanten geben die molare Konzentration an, bei der die Hälfte des Enzyms mit Substrat abgesättigt ist (Grüner 1967, S. 155).

Vorteile der ADH-Methode:

Der entscheidende und hervorragende Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, daß das ADH ein Enzym von ausgesprochener Gruppenspezifität ist; die größte Affinität besteht zu Äthylalkohol (Grüner 1967, S. 171). Bei Verwendung von mehrfach umkristallisierten Fermentpräparaten reagieren unter der Katalyse selbst eines großen Überschusses an Ferment außer Äthylalkohol nur die geradketigen Isomeren von Butyl- und Propylalkohol (Bücher u. Mitarb. 1951) und Isopropanol. Diese Verbindung findet

in der Kosmetik Anwendung und kann außerdem in geringer Menge durch Reduktion von Aceton entstehen; sie ist allerdings erst in Konzentrationen von etwa 0,5 % in der Lage, Fehler hervorzurufen, wobei diese Konzentrationen die Fehlerbreite der Methode erheblich überschreiten (Dotzauer u. Mitarb. 1952; Grüner 1967, S. 171), während Methylalkohol und die physiologisch bedeutungsvollen Isomeren der höheren Alkohole, überhaupt eine Vielzahl Hydroxylgruppen tragender oder bei den derzeit geübten Alkoholbestimmungsverfahren störender Verbindungen, weder durch Reaktion noch durch Reaktionshemmung interferieren (Dotzauer u. Mitarb. 1952).

Eingehende Untersuchungen über die Spezifität des Hefe-Enzyms stammen von Dotzauer u. Mitarb. (1952), Barron u. Levine (1952), Gibor u. Parker (1958), Bernheim u. Mitarb. (1962) sowie von Weinig, Lautenbach und Schmidt (1963).

Auch Diabetes mellitus, Aceton, Chloroform und Äther stören das Verfahren nicht, ebensowenig alkoholfreie Desinfektionsmittel.

Weiterhin zeigte sich, daß die Bestimmung von Äthylalkohol im normalen Serum ohne weitere Vorbereitung durchgeführt werden kann (Dotzauer u. Mitarb. 1952).

Inhalationsversuche beim Menschen ergaben, daß bei Einhaltung der MAK-Werte und sogar geringer Überschreitung

derselben, selbst bei stundenlanger Einatmung verschiedener Dämpfe, keine das ADH-Verfahren nennenswert beeinflussende Anreicherung der Inhalationsmittel stattfindet (Weinig, Lautenbach und Schmidt 1963).

Nachteile bzw. Fehlermöglichkeiten

Der Katalysator reagiert mit anderen, der gesuchten Substanz ähnlichen Verbindungen (Grüner 1967, S. 171). So reagieren z.B. in der Fermentmethode aus der Reihe der Alkohole und anderer Stoffe, welche eine Hydroxylgruppe tragen, die geradkettigen, höheren Alkohole (ab den primären, geradkettigen, mehr als 4-C-Atome tragenden Alkoholen) und Isopropanol (Dotzauer u. Mitarb. 1952; Graf 1962).

Von Methylglykol, sekundärem Butylalkohol und Äthylenglykol werden z.B. schon 1/45 bis 1/30 scheinbar als Äthylalkohol bestimmt. Verunreinigungen von etwa 10 % der Gesamtblutmenge können hier schon zu erheblichen scheinbaren Erhöhungen der Alkoholkonzentration führen.

Zu folgeschweren Irrtümern müssen dagegen Verunreinigungen der Blutprobe mit Iso-Propylalkohol, primärem Butylalkohol, n-Propylalkohol und Allylalkohol führen, von denen schon geringe Beimengungen von 0,1 - 0,5 % zu einer Blutprobe, erhebliche scheinbare Äthanol-

spiegelerhöhungen verursachen. So wird z.B. eine 1 %ige Lösung von Iso-Propylalkohol als 0,17 ‰ Äthanol bestimmt. Die entsprechenden Werte sind für primären Butylalkohol 0,58 ‰, n-Propylalkohol 0,60 ‰ und für Alkylalkohol 0,63 ‰ (Grüner 1967, S. 172).

Normalseren und Seren von Diabetikern zeigten nach der Ferment-Methode ohne signifikante Differenzen einen Durchschnittssalkoholgehalt von 0,24 mg% aufweisend, bis zu 2 Größenordnungen niedrigere Werte als die Widmark-Methode (Bücher u. Mitarb. 1951). Ferner kann der Alkoholgehalt der Laboratoriumsluft zu Verfälschungen führen. Dieses Verhalten wird verständlich, wenn man bedenkt, daß der Alkoholgehalt in der Meßküvette bei mittleren Alkoholwerten in einer molaren Konzentration von 1 : 500 000 vorliegt. Schmidt (1963) fand eine Verfälschung schon dann, wenn die offene Küvette 5 min. dem Dampfdruck einer Lösung von 0,1 ‰ ausgesetzt war. Bei längerem Stehen ergaben sich Extinktionen, die einen Alkoholwert von mehreren Promille vortäuschen können. Der Dampfdruck einer 0,1 ‰ Alkohol enthaltenden Lösung liegt in der Größenordnung von 0,4 mmHg, d.h. weit außerhalb der Geruchswahrnehmung (Machata 1958; Schmidt u. Mitarb. 1963).

Die Reaktion kann weiterhin durch ähnliche Verbindungen, welche den Katalysator blockieren, unterbunden werden

- competitive inhibition - (Grüner 1967, S. 171), sodaß fehlerhafte, wohl auch meist zu niedrige Ergebnisse zustande kommen (Machata 1958).

Ebenso kann der Katalysator vergiftet oder zerstört werden, da ADH wie viele Fermente empfindlich gegen Schwermetallverunreinigungen ist (Dotzauer u. Mitarb. 1958); so beeinträchtigt z.B. die Gegenwart von Silbernitrat und Kupfersulfat die Resultate (Grüner 1967, S. 173) und die Empfehlung, die Lösungen mit aus Glas oder Quarz redestilliertem H_2O anzusetzen (wenn stark CO_2 -haltig zu evakuieren oder auszukochen) und "pro analysi"-Qualitäten der benötigten Reagenzien zu verwenden (Ammoniumsulfat p.a. wird zweckmäßig unter Zusatz eines Schwermetallbinders, z.B. Äthylendiamintetraacetat und wenig Ammoniak nochmals umkristallisiert), sollte unbedingt befolgt werden (Dotzauer u. Mitarb. 1952).

Ferner zeigt ADH eine erhebliche Empfindlichkeit gegenüber Gummi bzw. Vulkanisationsbeimengungen der Gummistopfen (Grüner 1967, S. 165).

Quantitative Unsicherheiten sind darauf zurückzuführen, daß:

- a) ein vollständiger stöchiometrischer Umsatz bei der Untersuchung nicht erreicht wird

- b) die gemessene Lichtauslöschung die Summe der Extinktionen der Leerwerte und des durch den Alkohol entstandenen DPNH ist
- c) die Forderung nach absoluter Reinheit des Semicarbazids nicht beachtet wird
- d) die Bedeutung des DPN-Gehaltes (d.h. dessen Einmessung mit größter Genauigkeit) vernachlässigt wird (Schmidt u. Mitarb. 1963)
- e) die Forderung, die Küvetten gleich hoch zu füllen, Streustrahlenschutzfilter zuzuschalten, nur bei warmem Gerät und konstantem Photostrom zu messen und die Außenseiten der Küvetten jedesmal blank zu wischen nicht beachtet wird
- f) die Bedingung, die Messung solle nur bei der angegebenen Wellenlänge erfolgen, übersehen wird; eine Messung bei 380 nm bringt z.B. Fehler von 63 % geringerer Extinktion als bei 366 nm und ein Fehler in der Extinktionsablesung von 0,005 bedeutet etwa 0,1 % Alkohol (Machata 1958).

Aus allen Untersuchungen geht u.a. hervor, daß das ADH-Verfahren als gruppenspezifisch anzusehen ist, und ein ADH-Wert nur dann hinreichend sicher auf Äthylalkohol bezogen werden darf, wenn sich die Anwesenheit anderer

Alkohole, vor allem n-Propyl-, n-Butyl-, Iso-Propyl- und Allylalkohol im Untersuchungsmaterial ausschließen läßt (Weinig, Lautenbach und Schmidt 1963).

2.3.3.1.1.

Modifikationen des ADH-Verfahrens

Obwohl es sich bei dem ADH-Verfahren an sich schon um eine schnelle, spezifische und relativ unkomplizierte Methode handelt, war dennoch immer wieder das Bedürfnis nach rascheren und vereinfachten Möglichkeiten zur Alkoholschnellbestimmung vorhanden.

Die nachfolgende Aufzählung ergibt eine Übersicht über die Bemühungen verschiedener Autoren nach weiteren Modifikationen des ADH-Verfahrens:

2.3.3.1.1.1.

Verfahren nach Kirk, Gibor und Parker (1958)

Die Autoren lassen den Alkohol bei Raumtemperatur in eine Enzymlösung diffundieren. Sie umgehen die Enteiweißung, kommen mit kleinsten Mengen von 10 µl aus und können mit ihrer Methode den Brutschrank entbehren, da die Diffusion bei Raumtemperatur erfolgt. Obwohl diese Methode für eine größere Anzahl an Bestimmungen durchaus geeignet ist, hat sie doch den Nachteil an, daß das hier verwendete

Filterpapier besonders präpariert werden muß mit einer Lösung von 20 %igem prim. Natriumphosphat und 2 %igem Magnesiumchlorid (Kirk u. Mitarb. 1958).

2.3.3.1.1.2.

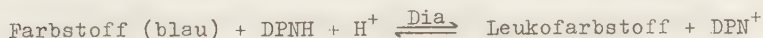
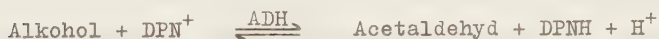
Verfahren nach Alha und Tamminen (1960)

Bei diesem Verfahren diffundiert ebenfalls der Alkohol unter Umgehung der Enteiweißung (im Widmark-Kölbchen) bei Raumtemperatur in eine aus Puffer-ADH- und DPN-Lösung bestehende Mischung hinein. Der Zeitaufwand beträgt jedoch 15 - 18 Stunden (Alha und Mitarb. 1960).

2.3.3.1.1.3.

Verfahren nach Machata (1961)

Machata verwendet Diaphorase, ein aus Clostridium Kluuyveri gewonnenes Ferment, das in gepufferten Lösungen imstande ist, Wasserstoff auf Redoxfarbstoffe zu übertragen. Diese Eigenschaft der Diaphorase läßt sich bei dem ADH-Verfahren auswerten. Es wirken dann zwei Fermente nach folgender Reaktionsgleichung zusammen:



(Machata 1961).

Die Vorteile dieser Methode liegen in ihrer größeren Schnelligkeit, der Umgehung der Enteiweißung und der Möglichkeit, die Messung im sichtbaren Bereich von 600 nm durchzuführen, sodaß ein Quarzspektrometer überflüssig ist und ein einfaches Filterphotometer mit einer Glühlampe als Lichtquelle genügt (Machata 1961).

Allerdings ist der Preis der verwendeten Fermente zu hoch, der Ausschlag des Photometer muß bei der Messung ständig beobachtet werden und die Einführung des dritten Fermentes, sowie eines empfindlichen Redox-Indikators machen das gesamte System zu unübersichtlich, vor allem da sich immer der O_2 der Luft an der Reaktion beteiligt und zu Rückreaktionen (Oxidation des Leukofarbstoffes zum Farbstoff) beiträgt, was sich in Ungenauigkeiten im Sinne eines zu niedrigen Alkoholgehaltes äußert (Machata 1961).

2.3.3.1.1.4.

Automatisierung des ADH-Verfahrens (Leithoff 1963)

Hierbei wird der Auto-Analyser verwendet, bei dem mit Hilfe einer "Walzenpumpe" (Schlauchpumpe) die Probe und die Reagenzien simultan durch die Analyse getrieben werden (Leithoff 1964, Leithoff 1963).

Diese Automatisierung, bei der die Enteiweißung ent-

fällt, bringt eine bedeutende Steigerung der Analysenfrequenz und hilft qualifizierte Arbeitskräfte einsparen (Leithoff 1963). Eventuelle Gerätefehler haben den Vorteil, daß sie konstant und leichter zu übersehen sind als individuelle Fehler, die aus momentaner Unachtsamkeit resultieren (Leithoff 1964). Außerdem gestatten es die Diagramme, dem Erfahrenen zu beurteilen ob die Analyse fehlerfrei arbeitet oder nicht (Leithoff 1964). Allerdings kommt es bei Benutzung der alten Durchflußküvette leicht zur Schaumentwicklung und Denaturierung des Enzyms in der Küvette (Grüner 1967, S. 183).

2.3.3.1.1.5.

Ultramethode zur ADH-Bestimmung (Leithoff u. Mitarb. 1964)

Sie stellt eine Modifizierung der von Mattenheimer (1961) angegebenen Ultramikromethode für die Alkoholbestimmung unter Verwendung der von Sanz (1959) berichteten Gerätekombination dar (Leithoff u. Mitarb. 1964) und zeichnet sich durch die Verwendbarkeit auch kleinster Mengen (5 - 10 Mikroliter) aus.

Der Zeitbedarf beträgt allerdings 70 min. und die Reproduzierbarkeit der Analysenwerte ist in hohem Maße von der besonderen Übung des Untersuchers und der Qualität der Probenpipetten abhängig. Darüberhinaus können leicht

Meßfehler entstehen, wenn in die 0,1 ml fassende Meßküvette des Kolorimeters Luftbläschen oder andere Verunreinigungen geraten (Leithoff u. Mitarb. 1964).

2.3.3.1.1.6.

Mikro-ADH-Verfahren (Bernt 1965)

Das ADH-Verfahren wird hier der Methodik nach dem Widmark-Verfahren angeglichen, dadurch der Arbeitsgang der Enteiweißung umgangen und die Trennung des Alkohols aus Blut oder Urin durch isotherme Destillation im Widmark-Kolben durchgeführt, wobei schon kleinste Mengen (0,01 ml) genügen; der Zeitbedarf jedoch liegt bei diesem Verfahren bei 90 Minuten (Bernt 1965).

2.3.3.1.1.7.

Einfaches Mikro-ADH-Verfahren nach Bremer und Tiess (1969)

Dieses Verfahren basiert auf der ADH-Methode nach Bücher und Redetzki (1951), unter Berücksichtigung der Vorschläge von Kirk u. Mitarb. (1958), Alha und Tamminen (1960), sowie Bernt (1965), eine Enteiweißung zu umgehen und den Alkohol direkt in eine Puffer-ADH-DPN-Lösung diffundieren zu lassen.

Es zeichnet sich durch seine relative Unkompliziertheit, geringen Materialaufwand, wenige Arbeitsschritte, kurze

Analysendauer (20 - 25 Proben in ca. 3 Stunden) und geringe Mengen (5 μ l) an Untersuchungsmaterial aus. Es ist ebenso für Einzel- wie auch für Reihenbestimmungen an Äthanolhaltigen Substanzen verschiedener Art in klinisch-chemischen, toxikologisch-analytischen und speziellen Alkoholuntersuchungslaboratorien anwendbar.

Seine Besonderheit liegt in folgenden Punkten:

- Variabilität für Schnellbestimmungen einzelner Proben bei 50° C und 20 min.
- Nutzvolle Überbrückung arbeitsfreier Zeiten (Wochenende) bei 4° C (Kühlschrank) und 4 - 40 Stunden.
- Anwendbar auch bei Fehlen von Brut- und Kühlschrank bei einer Raumtemperatur um 20° C und ca. 100 min. Reaktionsdauer.

Schwierigkeiten ergeben sich jedoch aus der Forderung, daß das Auftragen bzw. Einwägen der Proben möglichst rasch und mit annähernd gleicher Geschwindigkeit erfolgen muß (also geübtes Untersuchungspersonal), bei jedem Ansatz eine eigene Eichkurve aufzustellen ist und Konzentrationen über 3,5 ‰ nur meßbar sind, wenn die Proben verdünnt oder in noch geringerer Menge vorgelegt werden, was eine Erhöhung der Fehlerbreite zur Folge haben kann (Bremer und Tiess 1969).

2.3.3.1.1.8.

Vereinfachte ADH-Methode nach Eskes (1969)

In Anlehnung an Kirk, Gibor und Parker (1969) und Alha und Tamminen (1960) wird hier zusätzlich die Hamilton-Spritze für die Dosierung der Proben verwendet. Da bei dieser der Pumpen-Kolben bis in die Spitze der Nadel durchläuft, hat sie keinen "toten" Raum und es kann dadurch sehr schnell auf die nächste Blutprobe übergegangen werden. Durch den Wegfall der Enteiweißung und die Verwendbarkeit geringster Mengen (4 μ l Blut) ergibt sich eine bedeutende Arbeitersparnis.

Allerdings muß die Spritze äußerst sorgfältig gereinigt werden, um dem Ansetzen von Blutresten vorzubeugen (Eskes 1969).

2.3.3.1.1.9.

Verwendung von Hydrazinsulfat (rein) für die ADH-Methode (Lohse 1967)

Anstelle des beim ADH-Verfahren als Aldehydfänger wirksamen Semicarbazids wird reines Hydrazinsulfat verwendet, wobei jedoch bei höheren Alkoholgehalten eine schwach ansteigende Tendenz der mit Hydrazinpuffer gefundenen Extinktionen zu erkennen ist (Lohse 1967).

2.3.3.1.1.10.

Enzymatischer Schnellnachweis von Äthanol im Kapillarblut
(Weidemann 1969)

Kapillarblut oder Serum wird mit ADH und NAD enthaltendem Puffer bei Zimmertemperatur inkubiert. Das durch Dehydrierung von Äthanol zu Acetaldehyd entstehende NADH wird auf einem Filterpapierstreifen durch die Fluoreszenz im UV-Licht nachgewiesen. Der Nachweis auf Äthanol ist positiv, wenn die Auftragstelle der Probe deutlich hellblau fluoresziert. Die Intensität der Fluoreszenz ist abhängig von dem Alkoholgehalt. Durch Vergleich mit dem Standard kann leicht beurteilt werden, ob die Alkoholkonzentration über oder unter 1 ‰ beträgt.

Diese Methode stellt einen einfachen und schnellen enzymatischen Äthanolnachweis (ca. 10 min.) dar, umgeht die Enteiweißung und kommt mit geringsten Mengen (0,02 ml) aus. Ferner kann die Inkubation bei Zimmertemperatur erfolgen.

Allerdings muß während der Herstellung der Lösungen und der Durchführung des Nachweises die Laboratoriumsluft absolut frei von Alkohol und Aldehyden sein, und alle Lösungen müssen zum Schutz vor Alkoholdämpfen in gut verschlossenen Glas- oder Kunststoffgefäßen aufgehoben werden.

Vor Verwendung muß die Gebrauchslösung auf Zimmertemperatur gebracht werden.

Die Lösungen sind schon unbrauchbar, wenn der Leerversuch auch nur die geringste Fluoreszenz oder Hellgraufärbung im UV-Licht zeigt.

Weiterhin darf nur Filterpapier 2043 b mg (Schleicher und Schüll) verwendet werden und bei der Blutentnahme dürfen zur Handdesinfektion keine alkoholhaltigen Mittel angewandt werden.

3. Problemstellung

Aus den vorausgegangenen Ausführungen über den Stand der Möglichkeiten zur Blutalkoholbestimmung (auf direkte und indirekte Weise) geht deutlich hervor, daß das Bemühen um Methoden, die sich neben der absoluten Forderung nach großer Spezifität und Genauigkeit zusätzlich noch durch möglichst geringen Zeit- und Materialaufwand, sowie die Verwendbarkeit auch kleinster Probenmengen auszeichnen sollen, immer wieder im Mittelpunkt der angestrebten Bestrebungen steht. So sehr nun einzelne Verfahrensweisen, oft in bewundernswerter Weise, die eine oder andere Forderung in fast idealer Vervollkommenung zu erfüllen imstande sind, leiden sie doch alle unter dem gemeinsamen Mangel, eben nicht sämtlichen Ansprüchen auf einmal zu genügen.

Dies wird besonders in der letzten Zeit deswegen als störend empfunden, weil wir sowohl auf klinisch-toxikologischem, psychiatrisch-neurologischem sowie gerichtsmedizinischem Sektor (Schüppel 1969) einer zunehmenden Flut von alkoholbeeinflussten (Mallach 1967) und immer häufiger auch durch zusätzliche Arzneimittelintoxikationen erschwerten Krankheitsbildern gegenüberstehen (Soehring u. Mitarb. 1966).

Vor allem in Unfall- und Entgiftungsstationen steht der Aufnahmearzt immer häufiger vor der differentialdiagnostischen Schwierigkeit: handelt es sich bei dem vorliegenden Fall um

- a) eine alleinige Alkoholintoxikation
- b) eine reine Arzneimittelintoxikation
- c) eine Kombinationswirkung von Alkohol und Arzneimittel (Kapusz u. Mitarb. 1969)

die es zum Wohle des Patienten und für eine möglichst optimale und effektive Behandlung je schneller desto besser zu lösen gilt (Olischläger 1969).

Wenn man zusätzlich noch in Erwägung zieht, daß die Grenze, ab der sich auch relativ geringe Blutalkoholkonzentrationen im Zusammenhang mit Medikamenten tödlich auswirken können, bei ca. 1 ‰ liegt, wird man verstehen, weswegen trotz der unübersehbaren Zahl an Verfahren zur Blutalkoholbestimmung, immer wieder nach Methoden gesucht wird, die allen Forderungen, die die eben genannten Situationen aufzwingen, in möglichst "idealer" Weise gerecht werden.

Die von uns angestrebten modifizierten Untersuchungen an einem "einfachen Mikro-ADH-Verfahren zur Äthylalkoholbestimmung" nach Bremer und Tiess (1969) gingen aus

der oben genannten Problematik hervor und schienen den "Optimal-Forderungen" sehr nahe zu kommen (Osterhaus 1964; Böhle u. Mitarb. 1967).

Bremer und Tiess (1969) betonten, daß ihre einfache Mikro-ADH-Methode in der Genauigkeit den bekannten ADH-Verfahren gleichwertig sei, diese aber hinsichtlich Anwendungsbreite, Schnelligkeit und Ökonomie sowie Variationsmöglichkeit der Reaktionsbedingungen wesentlich übertreffe. Die Reaktionsbedingungen von 70 Minuten bei 25° C könnten z.B. für Schnellbestimmungen einzelner Proben über 20 min. bei 50° C oder zur nützlichen Überbrückung arbeitsfreier Zeiten bei 4° C (Kühlschrank) über 4 - 40 Stunden variiert werden (Bremer und Tiess (1969)).

3.1.

Definition und Abgrenzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit fand ihren Anstoß in der Veröffentlichung von Bremer und Tiess (1969) über eine "einfache ADH-Methode zur Äthylalkoholbestimmung".

Im Gegensatz zu ihnen, die zu einer Bestimmung als Reaktionszeit 70 min. bei etwa 25° C veranschlagten, sollte hier unter den gegebenen Bedingungen (Westdeutsche

Geräte und Lösungen) eine Beschleunigung der Analyse erzielt werden, deren Möglichkeit Bremer und Tiess (1969) in ihrer Arbeit andeuteten. Der Grund für diese Bemühung lag in der Forderung nach einer für den toxikologisch-klinischen Bereich jederzeit anwendbaren (nach Dienstschluß der Laboratorien an Wochenenden und Feiertagen, nachts) Schnellbestimmung zur Feststellung, Differenzierung bzw. Ausschluß von Alkoholbeeinflussung bei bewußtseinsgetrübten bzw. bewußtlosen Patienten.

Die Grenzen der Untersuchungen waren dadurch gegeben, daß bewußt nur leicht zugängliche und allgemein gebräuchliche Reagenzien und Materialien verwendet werden sollten.

4. Literatur zur Methodik

Neben der Anleitung zur Methodik nach Bremer und Tiess (1969) wurde als hauptsächliche Literatur die als Grundlage geltenden Vorschriften bzw. Beschreibungen der von Bücher und Redetzki (1951) entwickelten ADH-Methode und der Erprobung dieser zur Mikrobestimmung von Äthylalkohol nach Dotzauer, Redetzki, Johannsmeier und Bücher verwendet (1952).

Zusätzlich wurden noch die Vorschläge von Kirk u. Mitarb. (1958), Alha und Tamminen (1960) sowie Bernt (1965), eine Enteiweißung zu umgehen und den Alkohol direkt in eine Puffer-ADH-DPN-Lösung diffundieren zu lassen, berücksichtigt.

Besonders die Ausführungen von Machata (1958) "Zur Methodik der ADH-Bestimmung" fanden als zusätzliche Anleitung zur Methodik Beachtung.

Außerdem orientierten wir uns an Mattenheimers (1961) Abhandlung über Mikromethoden für das klinisch-chemische Laboratorium.

Die Vorschriften des Boehringer-Prospektes "Blutalkohol" Best.Nr. 15425 Biochemica-Test-Combination" zur Herstellung der Lösungen wurden genau eingehalten.

5. Material und Methodik

5.1.

Material

Untersucht wurden wässrige Alkohollösungen (Merck-Test-Ampullen) und Blutproben, die vom hiesigen Blutalkohol-Labor (im Rahmen polizeilicher Ermittlungen entnommen) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Untersuchungen erfolgten in der Blutflüssigkeit (Serum) (Leithoff u. Mitarb. 1964).

Es kamen Blutproben zur Verwendung, aus denen nach 5 min. Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen 2 ml Serum entnommen und in ein Reagenzglas von 10 ml eingebracht wurden.

Es bestanden keine besonderen Schwierigkeiten, es mußte lediglich darauf geachtet werden, daß wirklich nur Serum entnommen wurde.

Hämolytische Seren wurden nicht untersucht.

5.2.

Methodik

5.2.1.

Apparaturen

Wir bedienten uns für die modifizierte Mikro-ADH-Methode

nach Bremer und Tiess (1969) folgender Geräte:

Eppendorf-Photometer

Zentrifuge

Brutschrank

Je 1 Pipette zu 5 ml, 2 zu 1 ml, 1 zu 10 ml,
1 zu 2 ml, 4 Pipetten zu 5 μ l nach Resistance
(I_W)

Filterpapier nach Schleicher und Schülle Nr.
597 mit einer Abmessung von 5 x 10 ml

10 Widmark-Kölbchen mit einem Inhalt von 50 ml
1 braun gefärbte Flasche mit einem Inhalt von
250 ml zur Aufbewahrung der Puffer-ADH-DPN-
Lösung

5.2.2.

Reagenzien

Die Reagenzien wurden der Biochemica-Test-Combination
(Boehringer Mannheim, Best.Nr. 15425) entnommen. Nach
der Zugabe von Aqua bid. in der vorgeschriebenen Men-
ge enthält:

Flasche 1: 75 mM Pyrophosphat-Puffer, pH = 8,7
 75 mM Semicarbazid
 21 mM Glycin

Flasche 2: 24 mM NAD

Flasche 3: 30 mg ADH/ml

Als Alkohol-Standard-Lösungen wurden die wässrigen Äthanol-Lösungen von E. Merck (Art. 8985, Darmstadt) in Konzentrationen von 0,8 - 3,5 mg in einem ml verwendet.

Es kamen nur analysenreine Reagenzien und bidestilliertes bzw. entmineralisiertes Wasser zur Verwendung.

6. Arbeitsweise (nach Bremer und Tiess 1969)

Zwecks Untersuchung von 10 Proben - einschließelich einer Blind- und bei jeder Untersuchung 3 mitlaufenden Standardlösungen (für die Ansatzzeichkurve, die hier allerdings nicht extra aufgestellt wurde, es wurde vielmehr die im hiesigen Alkohollabor errechnete Eichkurve verwendet) - gaben wir zu 100 ml Pufferlösung 2,10 ml DPN-Lösung und 0,42 ml ADH-Suspension. 10 ml des frisch bereiteten Puffer-Ferment-Gemisches wurden in je ein Kölbchen pipettiert. In das Nüpfchen der Widmark-Kölbchen wird je ein Stück weichen Filterpapieres Nr. 597 (etwa 5 x 10 mm) gelegt. Auf diese Papierstücke brachten wir 5 μ l der Standardlösungen, der Blindlösung (Aqua bidest.) oder der zu untersuchenden Probe.

Leicht flüssige, homogene Proben (Dichte um 1,0) wurden mit den von uns verwendeten Mikropipetten durch 2-maliges Ausblasen auf die bereits in die Widmark-Nüpfchen eingelegten Filterpapierstückchen aufgebracht.

Das Auftragen der Proben mußte möglichst rasch und mit annähernd gleicher Geschwindigkeit erfolgen.

Die Einsätze wurden unmittelbar nach jeder einzelnen Probefüllung in die fortlaufend nummerierten Kölbchen gebracht. Nach einer Reaktionszeit von 20 min. bei 50° C

(im Brutschrank) erfolgte die Extinktionsmessung der Lösungen gegen den Blindwert an dem Eppendorf-Photometer konstant bei der Wellenlänge von 365 nm (wir verwendeten 366 nm und Glasküvetten-OS mit 1 cm Schichtdicke) in der Reihenfolge der Kolbennummerierung.

Die Ansatzzeichkurven, die bei Bremer und Tiess (1969) anhand der Messwerte der Standardlösungen aufgestellt werden, wurden bei uns nicht jedesmal gesondert errechnet, sondern die Eichkurve des hiesigen Alkohollabors (die allerdings auch nach den Standardlösungen von Merck aufgestellt wurde) verwendet. Die Ablesung der Äthylalkoholkonzentration erfolgte durch Vergleich der Extinktionen bei der Wellenlänge von 366 nm mit der entsprechenden Eichkurve, die jeweils bis etwa 3 ‰ geradlinig verläuft.

Konzentrationen über 3,5 ‰ wurden von uns nicht untersucht, da sie bei den von uns verwendeten Blutproben, die aus polizeilichen Ermittlungen stammten, praktisch nicht vorkamen.

Da bei dem von Bremer und Tiess (1969) geübten Verfahren - bei jedem Ansatz eine eigene Eichkurve aufzustellen - die von ihm angegebene Möglichkeit, die Reaktionsbedingungen in weiten Grenzen variieren zu können (z.B. für Schnellbestimmungen einzelner Proben: 50° C bei 20 min.)

durch die jedesmal aufzustellende Eichkurve, den Zeitgewinn durch diese Manipulation auf ein unbedeutendes Maß zusammenschrumpfen läßt, verzichteten wir bewußt auf diese zusätzliche zeitraubende Arbeitsbelastung und verwendeten - wie schon oben erwähnt - die "Dauer-Eichkurve" des hiesigen Alkohollabors unter steter Kontrolle durch die mitgeführten Testlösungen in der üblichen Weise.

7. Ergebnisse

Es wurden an insgesamt 40 Proben 3-fach-Bestimmungen durchgeführt. Außerdem wurde für jeweils 2 Proben (also 6 Untersuchungsgänge) eine wässrige Alkohol-Standard-Lösung mitgeführt, die ebenfalls 3-fach bestimmt wurde.

Da einige Proben (31) 3 - 6-fach gemessen wurden, um methodische Fehler von vorneherein zu erkennen, ergab sich so eine Gesamtzahl von 110 Untersuchungsgängen (jeweils mit 3-fach-Bestimmung des Alkoholwertes).

Nach den vom hiesigen Alkohollabor ermittelten Mittelwerten für den Alkoholgehalt der Proben nach dem Standard-ADH-Verfahren (Tabelle 2) wurden die von uns untersuchten Proben in einzelne Konzentrationsbereiche eingeteilt, sodaß sich folgendes Bild ergibt:

Gruppe	Konzentrationsbereich in %	Probenzahl	Untersuchungsgänge
1	1,0 - 1,49	15	31
2	1,50 - 1,99	14	37
3	2,00 - 2,49	10	33
4	2,50 -	1	9

Tabelle 2:

Nr.	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 4	
	Eigenes Verfahren	Standard- Verfahren	Eigenes Verfahren	Standard- Verfahren	Eigenes Verfahren	Standard- Verfahren	Eigenes Verfahren	Standard- Verfahren
1	1,44	1,47	1,43	1,52	2,50	2,43	2,34	2,58
2	1,35	1,47	1,50	1,52	2,38	2,43	2,50	2,58
3	1,61	1,47	1,87	1,94	2,21	2,43	2,34	3,21
4	1,35	1,47	2,31	1,94	2,24	2,43	2,39	2,50
5	1,74	1,47	1,91	1,94	2,33	2,43	2,13	2,50
6	1,17	1,24	2,23	1,94	2,49	2,43	2,66	2,59
7	1,46	1,24	2,06	1,80	1,89	2,05	2,61	2,92
8	1,03	1,24	1,66	1,80	1,49	2,05	2,37	2,59
9	1,47	1,24	1,69	1,80	2,41	2,25	2,05	2,73
10	1,12	1,10	2,12	1,80	2,04	2,25		
11	1,12	1,10	1,47	1,54	2,32	2,25		
12	1,32	1,10	1,52	1,52	2,26	2,25		
13	1,12	1,10	1,71	1,52	2,18	2,45		
14	1,35	1,46	1,60	1,52	2,21	2,37		
15	1,28	1,46	1,64	1,77	1,94	2,09		
16	1,33	1,46	1,82	1,91	2,01	2,09		
17	1,20	1,46	1,68	1,79	2,00	2,05		
18	1,01	1,06	1,66	1,79	1,96	2,07		
19	1,01	1,06	1,85	1,99	2,50	2,40		
20	0,99	1,16	1,94	1,88	2,43	2,35		

Nr.	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 4	
	Eigenes Verfahren	Standard- Verfahren	Eigenes Verfahren	Standard- Verfahren	Eigenes Verfahren	Standard Verfahren	Eigenes Verfahren	Standard- Verfahren
21	0,89	1,16	1,70	1,86	1,87	2,24		
22	1,19	1,19	1,48	1,56	2,07	2,24		
23	1,09	1,15	1,52	1,69	2,21	2,24		
24	1,37	1,46	1,85	1,97	2,00	2,15		
25	1,30	1,36	1,62	1,76	1,85	2,11		
26	1,02	1,10	1,58	1,76	1,76	2,02		
27	1,19	1,43	1,59	1,83	2,37	2,20		
28	1,09	1,32	1,56	1,59	1,87	2,20		
29	1,26	1,38	1,58	1,61	1,66	2,03		
30	1,24	1,11	1,38	1,61	2,07	2,14		
31	0,94	1,25	1,13	1,61	2,36	2,20		
32			1,21	1,75	2,10	2,39		
33			1,75	1,77	2,05	2,33		
34			1,68	1,70				
35			1,30	1,59				
36			1,73	1,76				
37			1,43	1,66				

Tabelle 2: Vergleichende Betrachtung der nach dem eigenen und nach dem Standard-ADH-Verfahren ermittelten Blutalkoholkonzentrationen (die Werte stellen Mittelwerte aus jeweils 3 Untersuchungen an einer Probe dar)

Parameter	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Durchschnittsabweichung zwischen eigenen und nach dem Standard-ADH-Verfahren gewonnenen Werten Δ in ‰	0,06	0,07	0,11	0,09
Δ in ‰ der Klassenmitte	4,8	4,0	4,4	3,2
Standardabweichung der Differenz zwischen eigenen und nach dem Standard-ADH-Verfahren gewonnenen Werten	0,16	0,21	0,19	0,51

Tabelle 3: Charakteristische Größen bei vergleichender Betrachtung zwischen eigenen und nach dem Standard-ADH-Verfahren gewonnenen Werten

Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die durchschnittliche Differenz zwischen den eigenen und den nach dem Standard-ADH-Verfahren gewonnenen Werten unabhängig von der Blutalkoholkonzentration sind. Die größte durchschnittliche Differenz ergibt sich bei der Gruppe 3 mit 0,11 ‰.

Bei der Gruppe 4 beträgt die durchschnittliche Differenz 0,09 ‰. Dieser Wert liegt zwar unter dem der Gruppe 3, was jedoch vermutlich darauf zurückgeführt werden kann,

daß in dieser Gruppe relativ wenige Messwerte vorlagen. Die Differenz zwischen den Abweichungen bei Gruppe 1 und 2 ist gering, was wiederum bedeutet, daß die Differenzen größenunabhängig sind.

Wenn man diese durchschnittlichen Differenzen in % der Klassenmitte ausdrückt, haben wir in Gruppe 1 die größte Abweichung zwischen dem eigenen und dem Standard-ADH-Verfahren. Die Werte der Gruppe 2 und 4 sind bedeutend kleiner als diejenigen der Gruppe 1 und 3, was unsere Feststellung, daß die Differenz größenunabhängig ist, erneut unterstreicht.

Die Standardabweichung ist bei Gruppe 4 am größten mit 0,51. Die Ursache dafür liegt in der geringen Anzahl der Messwerte. Bei Gruppe 1 und 3, bei denen die Anzahl der Messwerte jeweils über 30 lag, betrugen die Standardabweichungen 0,2. Dies weist wiederum daraufhin, daß es sich hierbei nicht um methodische Fehler handeln kann.

8. Diskussion und Zusammenfassung

Bei der von uns versuchten Modifikation (Temperaturerhöhung auf 50° C und Verkürzung der Reaktionsdauer auf 20 min.) des von Bremer und Tiess (1969) angegebenen Verfahrens wurden unsere Werte mit den Messwertreihen der am hiesigen Alkohollabor gefundenen Ergebnisse nach dem Standard-ADH-Verfahren verglichen.

Es ergab sich ein sehr stark signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen des Standardverfahrens (ADH-Methode) und denen des von uns durchgeführten.

Die Unterschiede zeigten keine "Regelmässigkeit", d.h. sie sind nicht durch einen systematischen Fehler hervorgerufen.

Als Tendenz zeigte sich allerdings, daß die Werte des neuen Verfahrens eher kleiner sind; die Differenzen-Summa ergibt bei allen vier Gruppen eine negative Zahl, außerdem sind die Abweichungen in die negative Richtung zahlenmäßig überwiegend.

Die Durchschnitte und Streuungen ergeben sich aus Tabelle 3.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, daß die Differenzen stark um einen Mittelwert streuen und die durchschnittlichen Differenzen unabhängig von der Klassen-

mitte sind. Die größte Streuung bei Gruppe 4 ist dadurch zu erklären, daß wenige Messwerte vorlagen und ein extrem hoher Wert von 3,21 ‰ die Ergebnisse verschob. Die Prozentwerte von $\bar{\Delta}$ weisen darauf hin, daß es sich um systematische Fehler handelt und nicht solche zufälliger Natur, was noch dadurch unterstrichen ist, daß dieselben Blutproben bei mehrmaligen Analysen abweichende Werte ergaben, z.B. bei Probe 4 (4 Untersuchungen) trat eine Streuung von 0,22 ‰ auf, bei einem Mittelwert von 1,28, d.h. 17 % !

Die Reproduzierbarkeit der versuchten Modifikation ist nach den obigen Ausführungen ungenügend gesichert.

Der Grund hierfür liegt vermutlich in der Tatsache, daß das verwendete Enzym ADH und das Coenzym DPN schon bei 25° C ihre optimale Arbeitstemperatur haben und Temperaturen über 30° C schon zu deutlichen Aktivitätsverlusten führen. (Bernt 1965). Bremer und Tiess (1969) konnten dies offenbar dadurch ausgleichen, daß sie bei jedem Ansatz eine eigene Eichkurve aufstellten, was uns jedoch für eine in der Praxis zu verwendenden Schnellmethode als unzumutbare zeitraubende Belastung erschien.

9. Literaturverzeichnis

1. ALHA, A.R., V. TAMMINEN:
Modification of the ADH-Method in the Determination
of Blood-Alcohol.
Ann. med. exp. Fenn. 38, 121 (1960)
2. AMMAN, E., F. GERSTENBRAND und G. SALEM:
Cerebrocranial Trauma and Alcoholism.
Wien. Med. Wschr. 110, 583 (1960)
3. ARNOLD, W.:
Plötzliche Todesfälle unter kombinierter
Schlafmittel- Alkohol-Einwirkung.
Kriminalistik 20, 497 (1966)
4. BARRON, E.S.G. und S. LEVINE:
Oxidation of Alcohols by Yeast Alcohol Dehydrogenase
and by the Living Cell. The Thiol Groups of the Enzyme.
Arch. Biochem. Biophysics 41, 175 (1952)
5. BERGER, W., P. SPRING:
Veränderung der Pharmakokinetik oraler Antidiabetika
durch medikamentöse Interferenz und Nieren-
insuffizienz.
Dtsch. med. Wschr. 50, 25 (1970)
6. BERNHEIM, J., V. SACHS und E. STEIGLEDER:
Systematische Untersuchungen mit dem ADH-Verfahren.
Ein Beitrag zur Spezifität der Methode.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 53, 28 (1962)

7. BERNT, A.:
Die Mikro-ADH-Bestimmung.
Wiss. Z. Martin-Luther-Univ. Halle-Wittenberg,
Math.-Naturwiss. 14, 76 (1965)
8. BÖHLE, E., H. v. LÜPLE, F. MELANI, H. DITSCHUNEIT:
Untersuchungen über die Wirkung einmaliger Alkohol-
belastungen auf den Fett- und Kohlehydratstoff-
wechsel des Menschen.
Med. u. Ernähr. 8, 106 (1967)
9. BONNICHSEN, R., H. THEORELL, F. HALSTRÖM, K. MÖLLER:
Alcohol in Post-Mortem Specimes; Comparative Deter-
minations by Widmark's and Zeisel-Fanto's Methods
and by ADH-Method.
Acta pharmacol. 11, 101 (1954)
10. BONNICHSEN, R.:
Der forensische Beweiswert toxikologischer Unter-
suchungsmethoden. Vortrag auf der 46. Tagung der
Dtsch. Ges. f. Gerichtl. Med. in Kiel am 8.9.1967
11. BREMER, H., D. TIESS:
Einfaches Mikro-ADH-Verfahren zur Äthylalkohol-
bestimmung.
Z. med. Labortechn. 10, 54 (1969)
12. BÜCHER, Th., H. REDETZKI:
Eine spezifische photometrische Bestimmung von
Äthylalkohol auf fermentativem Wege.
Klin. Wschr. 29, 615 (1951)

13. CORNISH, H.H., J. ADEFUIN:
Potentiation of Carbon Tetrachloride Toxicity
by Aliphatic Alcohols.
Arch. Environ. Health 14, 447 (1967)
14. CRAMER, K.:
Prediposing Factors for Lead Poisoning.
Acta med. Scand. 179, 56 (1966)
15. DOTZAUER, G., H. REDETZKI, K. JOHANNSMETTER,
Th. BÜCHER:
Erprobung einer spezifischen Fermentmethode zur
Mikrobestimmung von Äthylalkohol.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 41, 15 (1952)
16. DRAWERT, F., G. KUPFER:
Analyse von Blutalkohol.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 329, 90 (1962)
17. DUNLOP, M., D.H. CURNOW:
A System of Screening for the Presence of a
Number of Common.
J. clin. Path. 20, 204 (1967)
18. EEROLA, R.:
The Effect of Ethanol on the Toxicity of Hexobar-
bital, Thiopental, Morphine, Atropine and Scopo-
lamine. An Experimental Study on Mice.
Ann. Med. exp. Fenn. 39, 3 (1961)
19. EICKE, W.J.:
Zwischenfälle bei Einnahme von Meprobamat und
gleichzeitigem Genuß von Alkohol.
Int. Pharmacopsychiat. 3, 203 (1969)

20. ELBEL, H.:
Neue Ergebnisse der Blutalkoholforschung.
H. Unfallheilk. 66, 74 (1960)
21. Eskes, D.:
Blutalkoholbestimmung mittels einer vereinfachten
ADH-Methode.
Blutalkohol 6, 362 (1969)
22. FAZEKAS, J.G., B. RENGEI:
Vergleichende Untersuchung der Empfindlichkeit
verschiedener Alkoholprüfröhrchen mit der Blut-
alkoholbestimmungsmethode nach Widmark.
Blutalkohol 3, 141 (1965)
23. FINKLE, B.:
"Under the Influence" of Alcohol and Drugs.
Bulletin 5, 3 (1968)
24. FISCHER, H.-D.:
Der Einfluß von Barbituraten auf die Entgiftungs-
geschwindigkeit des Äthanols.
Biochem. Pharmacol. 11, 307 (1962)
25. FREY, H.:
Diss. Berlin 1952 (Humboldt-Universität)
In: Grüner, O.: Der gerichtsmedizinische Alkohol-
nachweis.
Heymanns Verlag Köln (1967)
26. GALEA, V., N. PREDA:
Der toxikologische Versuch als Interpretations-
mittel in der gerichtlichen Medizin.
Aktuelle Fragen gerichtl. Med. 3, 162 (1968)

27. GAULTIER, M., F. BODIN:
Alcool et intoxications aiguës.
Rev. Alcool. 13, 173 (1967)
28. GILDEMEISTER, H.:
Eine photometrische Methode zur Bestimmung des
Blutalkoholgehaltes.
Z. med. Labortechnik 9, 326 (1968)
29. GLASS, F., H. GOSSOW, H.J. MALLACH:
Beobachtungen und Untersuchungen über die gemein-
same Wirkung von Alkohol und Isonicotinsäurehydrazid.
Arzneimittel-Forsch. 14, 1203 (1964)
30. GLASS, F., H.J. MALLACH:
Tierexperimentelle Untersuchungen über die Alkohol-
wirkung nach längerer Belastung mit Isonicotin-
säurehydrazid.
Arzneimittel-Forsch. 15, 1069 (1965)
31. GLASS, F., H.J. MALLACH:
Beobachtungen und Untersuchungen über die gemein-
same Wirkung von Alkohol und A-Phenyl-A-Aethyl-
glutarsäureimid (Glutathimid).
Arzneimittel-Forsch. 16, 528 (1966)
32. GRAF, E.:
Blutalkohol-Bestimmung und Bewertung.
Dtsch. Apoth.-Ztg. 102, 1258 (1962)
33. GROSSKOPF, K.:
Technische Untersuchung von Gasen und Flüssigkei-
ten durch chromometrische Gasanalyse.
Angew. Chemie 63, 306 (1951)

41. IFFLAND, R.:
Ergebnis einer Vereinfachung der Blutalkohol-
bestimmung nach dem Vanadin-Schwefelsäureverfahren.
Blutalkohol 1, 52 (1968)

42. IFFSITS-SIMON, C.:
Fatal, Suicidal Chlorquine Poisonings.
Arch. Toxikol. 23, 204 (1968)

43. KAPUSZ, N., L. NAGY, H.-St, BRAUN, D. TIESS:
Die klinische Verwendung der ungarischen Alkohol-
sonde Pluralcol.
Dtsch. Gesundh.-Wes. 24, 2047 (1969)

44. KEEN, R.I.:
Blood Alcohol Levels: A Survey of Four Months in
Manchester.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 65, 110 (1969)

45. KIEL, F.W.:
Chloroquine Suicide.
J. Amer. med. Ass. 190, 398 (1964)

46. KIRK, P.L., A. GIBOR, K.P. PARKER:
Determination of Blood Alcohol Improvements in
Chemical and Enzymatic Procedures.
Analyt. Chem. 30, 1418 (1958)

47. KLEIN, H.:
Alkohol und Medikamente.
I. Fortschr. Med. 82, 169 (1964)

REZUMÉ, B.:

Alkohol und Medikamente.

Arch. Psychiat. Med. 22, 335 (1964)

Alkohol und Medikamente.

Neurol. Abh. 1, 9 (1964)

REZUMÉ, L.:

Die Wirkung der Wechselwirkung zwischen Alkohol
und Medikamenten mittels Varianzanalyse.

Neurol. Abh. 1, 305 (1967)

1. KOTLIKOVÁ SAUBELSKÁ, H., H. SYBERSKA:

Kreatininbestimmung von Nialamid mit Kationen-
elektrophorese bei suicidalen Vergiftungen.

Arch. Psychiat. 23, 226 (1968)

REZUMÉ, G.:

Neuropsychische Probleme unter Alkoholeinfluss.

Neurol. Abh. 1, 124 (1966)

REZUMÉ, P. M. LOSKOSKI, A. ALHA:

Die in der Galle nach Einnahme von Chinin

Arch. Psychiat. 22, 352 (1966)

REZUMÉ, H.:

Die automatische Methode der Blutalkoholbestimmung.

Neurol. Abh. 1, 329 (1963)

55. LEITHOFF, H.:
Die Automatisierung der enzymatischen Blutalkoholbestimmung (ADH-Methode).
Blutalkohol 2, 453 (1964)
56. LEITHOFF, H., S.Y. CHAN:
Eine Ultramikromethode zur enzymatischen Blutalkoholbestimmung (ADH-Methode).
Med. Welt 38, 2011 (1964)
57. LESTER, D., W.Z. KEOKOSKY, F. FELZENBERG:
Effect of Pyrazoles and other Compounds on Alcohol Metabolism.
Quart. J. Stud. Alcohol 29, 449 (1968)
58. LICKINT, F.:
Kann die Alkoholwirkung durch Medikamente gesteigert werden ?
Dtsch. Gesundh.-Wes. 14, 665 (1959)
59. LOHSE, E.:
Die Verwendbarkeit von Hydrazinsulfat (rein) für die Blutalkoholbestimmung nach der ADH-Methode.
Akt. Fragen gerichtl. Med. 2, 109 (1967)
60. MACHATA, G.:
Zur Methodik der ADH-Bestimmung.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 48, 26 (1958)
61. MACHATA, G.:
Die Diaphorase-methode zur Blutalkoholbestimmung.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 51, 186 (1964)

[illegible]

...
...
...
...

...
...
...
...
...
...
...

...
...
...
...
...

[Faint, illegible handwritten notes]

1. 凡在中华人民共和国境内从事生产经营活动的纳税人，均应当依照《中华人民共和国增值税暂行条例》的规定，缴纳增值税。
 2. 增值税的纳税人分为一般纳税人和小规模纳税人。
 3. 一般纳税人应当按照规定的方法和程序计算应纳税额。
 4. 小规模纳税人应当按照规定的征收率计算应纳税额。
 5. 纳税人应当按照规定的时间申报纳税。
 6. 纳税人应当按照规定的方法缴纳税款。
 7. 纳税人应当按照规定的方法计算进项税额。
 8. 纳税人应当按照规定的方法计算销项税额。
 9. 纳税人应当按照规定的方法计算应纳税额。
 10. 纳税人应当按照规定的方法计算应纳税额。

68. MEYER-DÖRING, H.:
Neuere biochemische Untersuchungen über die
Blutalkoholbestimmung beim Menschen.
Ärztl. Forsch. 14, 45 (1960)
69. MILNER, G.:
Cumulative Lethal Dose of Alcohol in Mice Given
Amitriptyline.
J. Pharm. Sci. 57, 2005 (1968)
70. NAGY, J., K. ZSIGMOND:
Alkoholnachweismethoden für Körperflüssigkeiten
und Ausatemungsluft.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 55, 242 (1964)
71. NOIRFALISE, A., J.M. PENELLE, C. HEUSGHEM:
Alcoolémie et traitements chimiothérapiques.
Arch. belges Méd. soc. 24, 473 (1966)
72. OLISCHLÄGER, K.:
Die klinische Anwendung der chromometrischen
Gasanalyse.
Diss. München (1968)
73. OSTERHAUS, E.:
Forensische Bedeutung von Medikamenten im
Straßenverkehr.
Blutalkohol 2, 395 (1964)
74. OSTERHAUS, E.:
Wissenschaftliche Grundlagen und Erfahrungen bei
gleichzeitiger Einwirkung von Medikamenten und
Alkohol.
Med. Sachverst. 60, 83 (1964)

15. RANKER, E.:
Kristalline Alcohol Dehydrogenase from Bakers' Yeast.
J. Biol. Chem. 194, 313 (1950)
16. REBETIK, H. und K. JOHANNSMETTER:
Grundlagen und Ergebnisse der enzymatischen Äthyl-
alkoholbestimmung.
Arch. Toxikol. 16, 73 (1956)
17. SACHS, E.:
Widmark- und Fermentanalyse des Blutalkohols in
der Praxis.
Arch. Lab. 2, 77 (1956)
18. SÄMKE, T.:
Die Bedeutung des Atemalkoholnachweises in der
forensischen Praxis.
Vierteljahrsschr. des Wägen-Werkes (Lübeck) 28, (1955)
19. SART, M.L.:
Physikalisch-chemische Grundlagen und apparative Neuent-
wicklungen in der quantitativen Ultramikroanalyse.
Klin. u. Laboratoriumspraxis 12, L 167 (1959)
20. SCHLICK, E.:
Ist ein Schnellverfahren zum Nachweis von Alkohol
in der Ausatemluft.
Z. ges. inn. Med. 8, 62 (1953)
21. SCHLICK, E. und H. FREY:
Ist ein neues Verfahren zum Nachweis von Alkohol
in der Ausatemluft.
Klin. Wochschr. 31, 317 (1953)

82. SCHLEYER, F., G. KAMM:
Alkoholbestimmung mit dem Eppendorf-Photometer.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 64, 27 (1968,1969)
83. SCHMIDT, O. und G. SCHULZ:
Fehler und Streuungen des ADH-Verfahrens.
Blutalkohol 2, 137 (1963)
84. SCHÜPPEL, R.:
Hemmung der Hydroxylierung von Arzneimitteln in
vivo unter Äthanolbelastung.
Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmak. 265, 156 (1969)
85. SCHULZ, E., H. BOERNER:
Suicide mittels oraler Antidiabetica (Sulfonyl-
harnstoffe).
Münch. med. Wschr. 108, 961 (1966)
86. SCHUTH, W.:
Suizidversuch mit Neoteben bei gleichzeitigem
Alkoholgenuss.
Münch. med. Wschr. 106, 2201 (1964)
87. SEIDEL, G., K. SOEHRING:
Zur Frage der Änderung der Blutalkoholwerte durch
Medikamente.
Arzneimittel-Forsch. 15, 472 (1965)
88. SMITH, S.E., A. HERXHEIMER:
Toxicity of Ethanol-Barbiturate Mixtures.
J. Pharm. Pharmac. 21, 869 (1969)

80. SOEHRING, K., R. SCHÜPPEL:
Wechselwirkungen zwischen Alkohol und Arzneimitteln.
Dtsch. med. Wschr. 91, 1892 (1966)
81. THEORELL, H. und R. BONNICHSEN:
Studies on Liver Alcohol Dehydrogenase.
I. Equilibria and Initial Reaction Velocities.
Acta chem. scand. 5, 1105 (1951)
82. FIESS, D.:
Das Blutalkoholbestimmungsgerät Breathalyzer in der
Praxis. I
Verh.-Med. 11, 271 (1964)
83. FIESS, D.:
Das Blutalkoholbestimmungsgerät Breathalyzer in der
Praxis. II
Verh.-Med. 12, 173 (1965)
84. FIESS, D., K.-H. NAGEL:
Das Blutalkoholbestimmungsgerät Breathalyzer in der
Praxis. III
Verh.-Med. 13, 1 (1966)
85. FIESS, D., H.-St. BRAUN; L. NAGY, N. KAPUSZ:
Alkohol und Verkehrssicherheit. Konferenzbericht
der 5. internationalen Konferenz über Alkohol und
Verkehrssicherheit. Freiburg i.Br.
W.V. Schulz Verlag Freiburg i.Br. (1969)
86. FIESS, D., L. NAGY, H. BREMER:
Aufbau, Funktion und Anwendung der ungarischen
Alkoholsonde Pluralcol.
Verh.-Med. 16, 493 (1969)

96. TIESS, D., N. KAPUSZ:
Über den Einsatz der Pluralcol-Sonden im Straßen-
verkehr.
Verk.-Med. 17, 1 (1970)
97. VALLEE, B.L., F.L. HOCH:
Yeast Alcohol Dehydrogenase, a Zinc Metalloenzyme.
J. amer. chem. Soc. 77, 821 (1955)
98. VAPATAALO, H., H. KARPPANEN:
Combined Toxicity of Ethanol with Chlorpromazine,
Diazepam, Chlormethazole or Pentobarbital in Mice.
Agent and Actions 1, 43 (1969)
99. VIDIC, E.:
Blutalkoholbestimmung nach dem Vanadinschwefel-
säureverfahren.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 55, 242 (1964)
100. WAGNER, H.-H.:
Über das Ausmaß der Belastungen des Herz- und Kreis-
laufsystems bei Verwendung der Alcotest-Röhrchen.
Medizinische 16, 785 (1959)
101. WAGNER, H.-J.:
Vergleichende Untersuchungen über die zahlenmässige
Beziehung zwischen medikament- bzw. alkoholbeein-
flussten Verkehrsteilnehmern.
Zbl. Verkehrs-Med. 9, 132 (1963)
102. WANGEL, J.:
Alcohol Road Traffic and Drugs in Denmark. In:
Alcohol and Road Traffic.
Proc. 3rd Internat. Conference, London 1962 (1963)

103. WARBURG, O., W. Christian:
Gärungs-Co-Ferment.
Biochem. Z. 285, 156 (1936)
104. WARBURG, O.:
Wasserstoffübertragende Fermente.
Verlag Dr. Werner Saenger GmbH Berlin (1948)
105. WEIDEMANN, G.:
Enzymatischer Schnellnachweis von Äthanol im
Kapillarblut.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7, 560 (1969)
106. WEINIG, E., W. SCHWERD, L. LAUTENBACH:
Die Neubildung von Äthanol, Methanol und anderen
Alkoholen im Leichenblut und ihre forensische
Bedeutung.
B. itr. gerichtl. Med. 21, 114 (1961)
107. WEINIG, E., L. LAUTENBACH, G. SCHMIDT:
Zur Frage der Störung des ADH-Verfahrens durch
Einatmung flüchtiger Stoffe.
Blutalkohol 2, 193 (1963)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat.

Frau M. Péteny möchte ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Lebenslauf

Name : Michael Becker

geboren am : 27. Februar 1944

in : Wiesbaden

Staatsangehörigkeit : deutsch

Name der Eltern : Martin Becker,
techn. Kaufmann
Johanna Becker, geb. Weyl

Schulbildung : 1950-1952 Volksschule in Wiesbaden
1952-1954 Volksschule in Nördlingen
1954-1963 Humanistisches Gymnasium
in Nördlingen

Militärzeit : 1963-1965

Studiengang : Studium der Medizin an der
Universität Erlangen-Nürnberg
WS 1965/66 bis WS 1971/72

Prüfungen : Abitur im Juni 1963
Vorphysikum 3. November 1966
Physikum 9. August 1968
Medizinisches Staatsexamen
18. Februar 1972

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
